

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO CINAMALDEIDO E  $\alpha$ -TERPINEOL**  
**FRENTE BIOFILMES ENDODÔNTICOS**

**NADINY CEZAR RODRIGUES**

**LEOPOLDINA DE FÁTIMA DANTAS DE ALMEIDA**

**JOÃO PESSOA**

**2019**

**NADINY CEZAR RODRIGUES**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO CINAMALDEIDO E  $\alpha$ -TERPINEOL  
FRENTE BIOFILMES ENDODÔNTICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Graduação em  
Odontologia da Universidade Federal da  
Paraíba em cumprimento às exigências  
para conclusão.

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida**

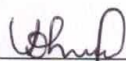
**JOÃO PESSOA**

**2019**

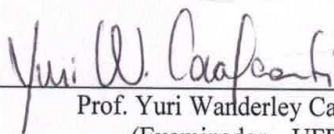
**NADINY CEZAR RODRIGUES**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Graduação em  
Odontologia, da Universidade Federal da  
Paraíba em cumprimento às exigências para  
conclusão.

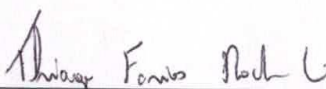
Monografia aprovada em 06 / 05 / 2019



Prof.<sup>a</sup>. Leopoldina de Fátima D. A. Cavalcanti  
(Orientadora – UFPB)



Prof. Yuri Wanderley Cavalcanti  
(Examinador – UFPB)



Prof. Thiago Farias Rocha Lima  
(Examinador – UFPB)



Prof.<sup>a</sup>. Simone Alves de Sousa  
(Examinadora – UFPB)

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	11
MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
RESULTADOS .....	13
DISCUSSÃO.....	16
CONCLUSÃO .....	18
REFERÊNCIAS.....	18
NORMAS DA REVISTA.....	21

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO CINAMALDEIDO E  $\alpha$ -TERPINEOL  
FRENTE BIOFILMES ENDODÔNTICOS**

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CINAMALDEIDO AND  $\alpha$ -TERPINEOL  
AGAINST ENDODONTICS BIOFILMS**

Nadiny Cezar RODRIGUES<sup>1</sup>

Maria Heloisa de Souza BORGES<sup>1</sup>

Leopoldina de Fátima Dantas de ALMEIDA<sup>2</sup>

1. Graduanda em Odontologia pela Universidade Federal da Paraíba, UFPB, João Pessoa, PB, Brasil.

Telefone: (83) 99869-9725 – e-mail: nadinycrodrigues@outlook.com

Telefone: (83) 98893-9465 – e-mail: heloisaboorges@gmail.com

2. Professora Doutora do curso de Odontologia da Universidade Federal da Paraíba, UFPB, João Pessoa, PB, Brasil

Endereço de correspondência: Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde - Campus I, Departamento de Clínica e Odontologia Social. Campus Universitário - Cidade Universitária, Castelo Branco 58051900 - João Pessoa, PB – Brasil.

Telefone: (83) 3216-7251

e-mail: leopoldinalmeida@hotmail.com

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar a atividade antimicrobiana do cinamaldeído e  $\alpha$ -terpineol frente biofilmes endodônticos. **Métodos:** Canais radiculares de raízes bovinas foram instrumentados com limas K (#45 a 60) com movimentos de limagem e alargamento, sob irrigação constante com água destilada, e remoção de *smear layer* com EDTA 17%. Após, foram esterilizados por óxido de etileno e formado biofilme no interior dos canais. A concentração celular utilizada para *E. faecalis* foi de  $1 \times 10^8$  UFC/mL em meio BHI e o cultivo realizado por 14 dias consecutivos (37°C, microaerofilia). No 15º dia os biofilmes foram expostos ao cinamaldeído (Cin) e  $\alpha$ -terpineol (Terp) na concentração de 10 mg/mL, durante 16 min, à 37°C. Após, os canais foram lavados com solução salina, adicionado meio BHI e as amostras reincubadas por 24h. Foram utilizadas soluções de meio BHI, como controle negativo; hipoclorito de sódio (NaOCl) e clorexidina (CHX), ambos a 2%, como controles positivo. Os biofilmes foram analisados segundo a viabilidade celular (UFC/mL) (n=9/grupo) e a dosagem de proteínas totais (n=8/grupo). Aplicou-se os testes de Kruskal Wallis e Mann Whitney, para a viabilidade celular e ANOVA e Tukey para a dosagem de proteínas totais ( $\alpha=5\%$ ). **Resultados:** Para a contagem de UFC/mL, o Cin apresentou o mesmo metabolismo da CHX ( $p>0,05$ ), ambos diferiram do controle negativo, do Terp e do NaOCl ( $p<0,05$ ). Só houve diferença na produção de proteínas totais entre o controle negativo e o Cin ( $p<0,05$ ). **Conclusão:** O cinamaldeído foi a substância que apresentou efeito antibacteriano frente biofilme endodôntico comparável a clorexidina a 2%.

**Palavras-chave:** Microbiologia, Biofilmes, *Enterococcus faecalis*.

## ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the antimicrobial activity of cinnamaldehyde and  $\alpha$ -terpineol against endodontic biofilms. **Methods:** Bovine Root canals were instrumented with K (#45 to 60) with filing and enlargement movements, under constant irrigation with distilled water, and smear leayer removal with 17% EDTA. Afterwards, they were sterilized by ethylene oxide and a biofilm cultivated in the channels. The cell concentration used for *E. faecalis* was  $1 \times 10^8$  CFU / mL in BHI medium and the culture was performed for 14 consecutive days (37°C, microarephilia). On day 15 the biofilms were exposed to cinnamaldehyde (Cin) and  $\alpha$ -terpineol (Terp) at 10 mg / mL for 16 min, at 37°C. BHI medium was added and the samples reincubated for 24h. BHI medium solutions were used as negative control; sodium hypochlorite (NaOCl) and chlorhexidine (CHX), at 2%, as a positive control. The biofilms were analyzed according to the cellular viability (CFU/mL) (n=9/group) and the total protein concentratio (n=8/group). The Kruskal Wallis and Mann Whitney tests were applied for cell viability and ANOVA and Tukey for the determination of total proteins ( $\alpha=5\%$ ). **Results:** For the UFC/mL count, the CH showed the same CHX metabolism ( $p>0.05$ ), both differed from the negative control, Terp and NaOCl ( $p<0.05$ ). There was only difference in the production of total proteins between the negative control and Cin ( $p<0.05$ ). **Conclusion:** Cinnamaldehyde was the substance that presented antibacterial effect against endodontic biofilm comparable to chlorhexidine 2%.

Key words: Microbiology, Biofilms, *Enterococcus faecalis*.

## Introdução

O biofilme representa um ecossistema complexo, composto por microrganismos aderidos a um substrato sólido, na presença de matriz extracelular [1]. A cavidade bucal é colonizada pelo biofilme oral, geralmente associado ao processo de surgimento de lesões de cárie dentária. No entanto, outros biofilmes, a exemplo do endodôntico, podem estar presentes na cavidade oral, no interior do sistema de canais radiculares [2].

As espécies mais prevalentes no biofilme endodôntico são *Actinomyces* sp. oral, *Ropionibacterium*, *Prevotella* sp. Oral e *Streptococcus* [3], além destes destaca-se a presença do *Enterococcus faecalis* [4], que em infecções endodônticas pode levar a lesões refratárias, mais difíceis de serem tratadas. Isto se deve tanto a complexidade dos canais, quanto a virulência do microrganismo e sua capacidade de penetrar os tubos dentinários [5], de tal modo que mesmo após o tratamento ele pode permanecer viável. Esses biofilmes endodônticos também podem estar associados a outros microrganismos, a exemplo da *Candida albicans* [6].

Assim, a tríade do tratamento endodôntico reflete a filosofia de desinfetar, modelar e obturar o sistema de canais radiculares. Desta forma, para o sucesso é preciso eliminar completamente os microrganismos causadores da infecção endodôntica [7]. Para isso, faz-se necessário utilizar de métodos mecânicos e químicos, realizando a instrumentação e irrigação concomitante desses canais [8].

O preparo químico mecânico do sistema de canais radiculares inclui o uso de soluções irrigadoras auxiliares. Substâncias como a clorexidina (CHX) e o hipoclorito de sódio (NaOCl), são amplamente empregados devido a ação antimicrobiana que apresentam [8,9]. A clorexidina é uma bisbiguanida catiônica, com elevada substantividade [10], sendo empregada a 2% [11]. Já o NaOCl, derivado de halogênio, tem a capacidade de dissolução de tecido pulpar [12], bem como alto poder antimicrobiano a depender de sua concentração, geralmente empregada entre 0,5 a 5,25% [9].

Embora estas substâncias sejam amplamente utilizadas, alguns estudos demonstram efeitos adversos [13,14]. A clorexidina, embora seja um potente antimicrobiano, não apresenta a capacidade de atuar sobre matéria orgânica, apresenta citotoxicidade e genotoxicidade a depender da concentração utilizada e causa manchamento dental e precipitado marrom se seu uso for associado com NaOCl [15]. Enquanto o NaOCl pode alterar a composição da dentina, prejudicando sua interação com resinas adesivas, que são comumente utilizadas para unir os materiais restauradores à dentina tratada [13], assim como causar diminuição da microdureza da dentina dos canais radiculares, podendo levar a fratura do elemento tratado [14].

Dessa forma o estudo sobre soluções irrigadoras que apresentem menos efeitos adversos, mas com capacidade de desinfecção é recorrente [5, 15, 16]. O cinamaldeído é um fitoconstituente extraído da casca da canela o qual atua desintegrando a parede celular, inibindo a proliferação bacteriana [17]. O  $\alpha$ -terpineol é extraído de várias fontes, como a *Melaleuca alternifolia*, planta nativa da Austrália [18] e causa desestabilização da membrana celular [19], determinando desequilíbrio osmótico.

Tendo em vista os mecanismos de ação do cinamaldeído e  $\alpha$ -terpineol, estes fitoconstituintes podem se mostrar eficazes contra *E.faecalis*. A partir do exposto, este estudo teve por objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do cinamaldeído e  $\alpha$ -terpineol frente biofilmes endodônticos, a fim de comprovar a eficácia desses fitoconstituintes como solução irrigadora.

## MATERIAIS E MÉTODOS



### **Preparação dos espécimes**

Incisivos centrais bovinos com raízes completamente formadas foram utilizados como substrato para o desenvolvimento dos biofilmes. As raízes foram separadas da porção coronária com auxílio de disco diamantado em baixa velocidade, sob abundante irrigação e seccionadas com dimensão média de 30mm de comprimento. Os debris de ligamento periodontal e tecido pulpar foram removidos com auxílio de lâmina de bisturi nº 12 e limas endodônticas.

Após, as raízes foram armazenadas em solução de timol a 0,1% durante 90 dias. Posteriormente, os canais radiculares foram instrumentados com limas K flexofile (#45-60) realizando movimentos de limagem e alargamento, sob irrigação constante com água destilada. O instrumento memória foi padronizado (#60) e ao final, a *smear layer* foi removida a partir da lavagem com EDTA à 17% (Maquira, Brasil), com 3 ciclos de 20s, com agitação do instrumento memória, encerrando com irrigação com água destilada. Os ápices foram restaurados com resina composta (Fill Magic, Coltene), pela técnica adesiva e as superfícies externas das raízes foram impermeabilizadas da porção média a apical com selante para unhas (Colorama, Brasil). Antes do início do experimento, as raízes foram fixadas com fio ortodôntico e cera em placas de 24 poços e esterilizadas com gás óxido de etileno (SETE Esterilização, Cabedelo, Brasil).

### **Desenvolvimento do biofilme**

Cepa de referência de *E. faecalis* (ATCC 29212) foi reativada em caldo de infusão de coração (BHI, Disco Laboratories Inc., Detroit, MI, EUA) e mantida em estufa à 37°C por 24h. Após, a densidade óptica (DO=0,1) foi determinada em espectrofotômetro (LGI SCIENTIFIC, São Paulo, Brasil) em 600nm de comprimento de onda, considerando a densidade celular de  $1 \times 10^8$  UFC/mL. Após, 100µL do inóculo foram inseridos nos canais radiculares, e as amostras mantidas em estufa à 37°C, durante 14 dias, em microaerofilia. A cada 48h foi realizada troca de meio, sem adicionar novos microrganismos.

### **Preparo das substâncias**

O cinamaldeído (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e o  $\alpha$ -terpineol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) foram utilizados na concentração de 10mg/mL, preparados em meio BHI estéril e 0,1% de Tween 80. Como controle negativo foi utilizado BHI, e controle positivo, hipoclorito de sódio (Dilecta, João Pessoa, PB) e clorexidina (Dilecta, João Pessoa, PB), ambos diluídos em meio BHI para atingir a concentração de 2%.

### **Protocolo de exposição às substâncias**

Após o cultivo do biofilme, no 15º dia, os espécimes foram divididos em grupos (n=9) e expostos aos fitoconstituintes e controles positivo e negativo. Para o protocolo experimental foi removido o meio, e em cada canal radicular foram inseridos 100µL das soluções previamente preparadas e as amostras incubadas por 10 minutos em estufa à 37°C.

O tempo de exposição estipulado considerou a etapa de irrigação e aspiração durante o uso de cinco instrumentos endodônticos, na tentativa de mimetizar a condição clínica do tratamento endodôntico. Em seguida, as substâncias foram removidas e os canais foram lavados com solução salina estéril. Por fim, foi inserido 100µL de meio em cada canal radicular e as amostras reincubadas por 24h adicionais. Os biofilmes foram analisados de acordo com o número de células viáveis (UFC/mL) e produção de proteínas totais.

### Contagem de Células Viáveis

Para a contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL), os espécimes foram transferidos para tubos contendo 1,0mL de solução salina estéril, sendo submetidos à agitação em vórtex por 30 segundos, seguida da diluição seriada das alíquotas para determinação do número de microrganismos viáveis ( $10^{-6}$  até  $10^{-11}$ ).

Em seguida, foram semeadas alíquotas de 10 $\mu$ L, em placas de ágar BHI, para contagem de *E. faecalis*, em triplicata, correspondente a cada diluição seriada. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. A contagem do número de células viáveis foi realizada e os valores multiplicados pela diluição seriada e convertidos em escala logarítmica.

### Dosagem de Proteínas Totais

A dosagem de proteínas totais foi realizada segundo o Ensaio do Ponto Final, utilizando o ensaio de biureto. Os espécimes foram transferidos para tubos contendo 1,0mL de solução salina estéril e submetidos à agitação em vórtex. O sobrenadante foi centrifugado por 10min e após foi deixado apenas o pellet, onde foi acrescentado 50 $\mu$ L de NaOH à 1M e vortexado. Para a lise celular, de acordo com as recomendações do fabricante, foi adicionado em tubos, 20 $\mu$ L das amostras e 1,0 mL do reagente biureto. Em um tubo sem amostra, para definir o padrão foi adicionado 20 $\mu$ L do padrão do teste e para o branco, 20 $\mu$ L de solução salina. As amostras foram incubadas por 10 minutos à 37°C. Após, a leitura foi realizada em um espectrofotômetro e a absorbância determinada a 495nm. A dosagem de proteínas totais (g/dL) foi calculada dividindo a absorbância do teste (AT) pelo fator de calibração (FC), que foi definido a partir do padrão do teste, multiplicado por quatro (AT/FC\*4g/dL).

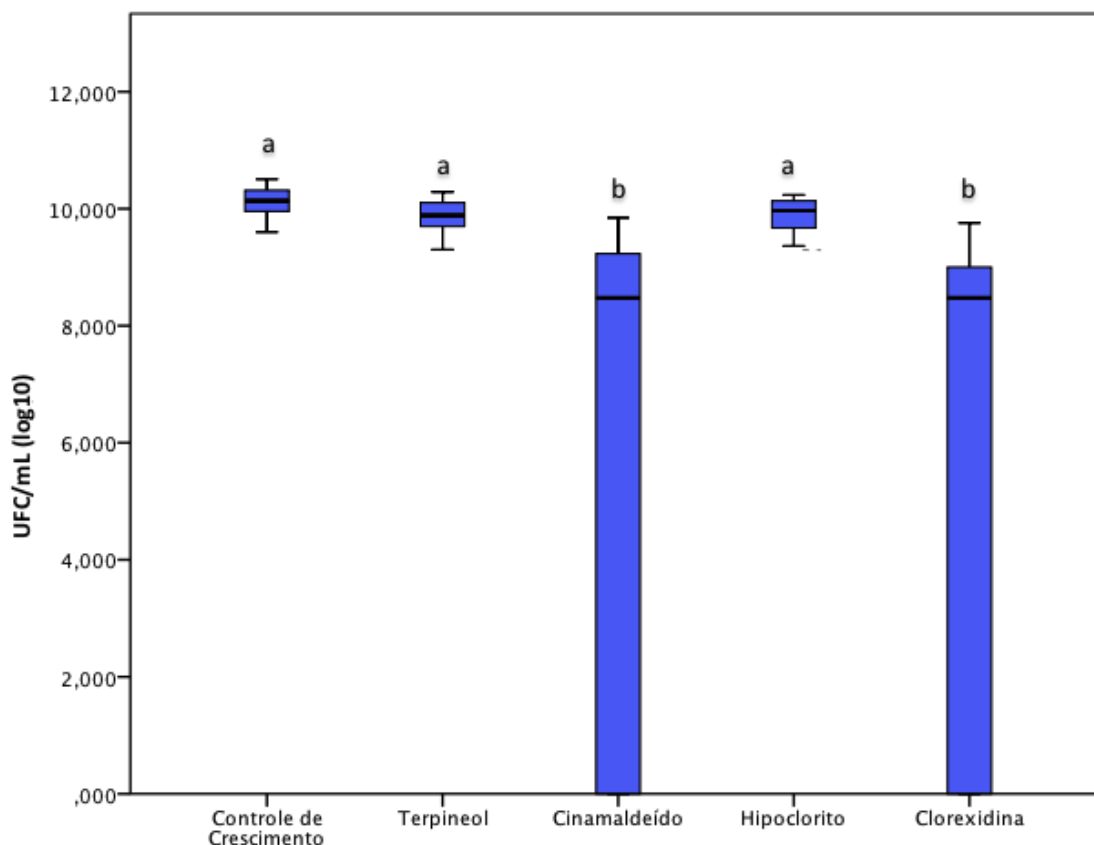
Após, os dados referentes a concentração de proteínas foram normalizados pela contagem de células viáveis, assim os valores em g/dL foram divididos pelo valor do log de UFC/mL e transformados em uma razão. Este artifício metodológico foi realizado na tentativa de minimizar o erro de medição para as amostras expostas ao NaOCl e CHX. As justificativas para esta transformação serão descritas durante a discussão.

### Análise dos dados

Os dados foram analisados quanto à distribuição e homogeneidade. Para dados paramétricos (proteínas totais) empregou-se Análise de Variância (ANOVA One-way) complementada por Tukey. Para dados não paramétricos utilizou-se os testes de Kruskal-Wallis e Mann Whitney (número de células viáveis e razão entre a concentração de proteínas totais/UFC/mL). A análise estatística foi realizada no software SPSS (Statistical Package for Social Sciences, IBM, Chicago, IL, USA), com nível de significância de 5% ( $\alpha < 0,05$ ).

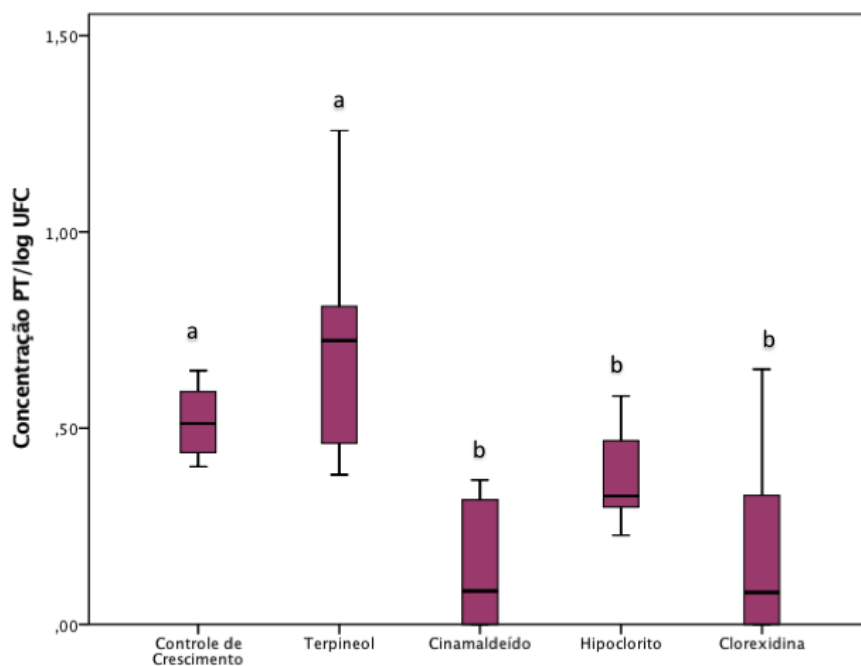
### Resultados

A contagem média de UFC/mL (figura 1), em escala logarítmica, para os grupos expostos a clorexidina e cinamaldeído foi de 1,0 e 1,4 (UFC/mL), os quais diferiram estatisticamente do controle de crescimento ( $p < 0,05$ ). Verificou-se também que os grupos expostos ao NaOCl e  $\alpha$ -terpineol não diferiram estatisticamente do controle de crescimento ( $p > 0,05$ ), o qual apresentou contagem de UFC/mL de 15,1 ( $\pm 8,5$ ). Os controles positivos, hipoclorito e clorexidina, diferiram entre si ( $p < 0,05$ ).



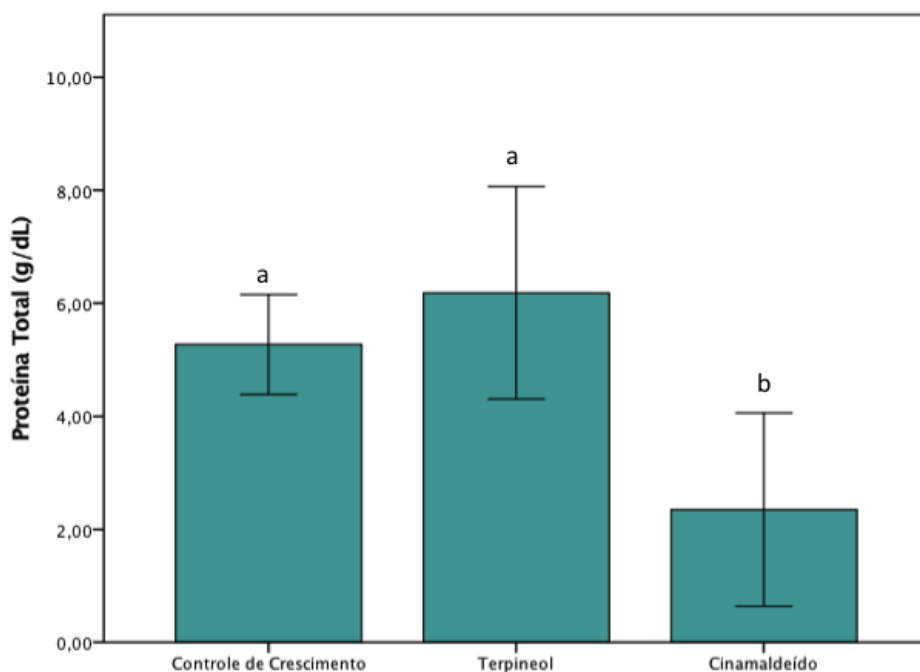
**Figura1:** Viabilidade celular dos biofilmes cultivados por 14 dias (n=9). Letras distintas apresentam diferença estatística (Mann Whitney,  $p < 0,05$ ). \*\*Diagrama de caixas onde: cada caixa contém 50% dos dados do grupo; os limites inferiores e superiores das caixas representam os percentis 25 e 75, respectivamente; as extremidades das antenas representam os valores mínimo e máximo do grupo; e a linha horizontal no interior da caixa representa a mediana.

Verificou-se que a concentração de proteínas totais, determinadas pela razão exposta na figura 2, foi superior no grupo tratado pelo  $\alpha$ -terpineol, de modo similar ao controle de crescimento ( $p > 0,05$ ). Não foram detectadas diferenças estatísticas entre as amostras expostas ao cinamaldeído, NaOCl e CHX ( $p > 0,05$ ).



**Figura 2:** Normalização dos dados da concentração de proteínas totais (g/dL) pelo valor de UFC/mL (log UFC/mL), dos biofilmes cultivados por 14 dias. (n=8)\*\*Letras distintas apresentam diferença estatística (Mann Whitney,  $p < 0,05$ ). \*\*Diagrama de caixas onde: cada caixa contém 50% dos dados do grupo; os limites inferiores e superiores das caixas representam os percentis 25 e 75, respectivamente; as extremidades das antenas representam os valores mínimo e máximo do grupo; e a linha horizontal no interior da caixa representa a mediana.

Em relação à comparação direta das concentrações de proteínas totais produzidas pelos biofilmes expostos aos fitoconstituintes e o controle de crescimento, verificou-se que o cinamaldeído foi capaz de diminuir a produção de proteínas presentes, em comparação ao  $\alpha$ -terpineol e controle de crescimento ( $p < 0,05$ ). A concentração média entre os grupos expostos ao cinamaldeído e  $\alpha$ -terpineol foi de 0,13g/dL ( $\pm 1,71$ ) e 0,40g/dL ( $\pm 2,61$ ), respectivamente (Figura 3).



**Figura 3:** Dosagem de proteínas totais, em g/dL, dos biofilmes cultivados por 14 dias (n=8). Letras distintas apresentam diferença estatística (Tukey,  $p < 0,05$ ). \*\* Colunas representam médias e barras representam desvio-padrão.

## Discussão

A terapêutica endodôntica está pautada principalmente no conceito de eliminação da contaminação e conteúdo tóxico do sistema de canais radiculares, removendo completamente o tecido pulpar, restos de dentina e microrganismos, para isto utiliza-se de métodos químicos e mecânicos. Os irrigantes irão aumentar a eficácia da instrumentação, pois irão auxiliar na remoção de detritos, dissolvendo tecido e desinfetando os canais radiculares [20].

Assim, a busca por substâncias auxiliares irrigadoras, que apresentem efeito antimicrobiano em baixas concentrações, com efeitos adversos mínimos, é um desafio [5, 15, 16]. Vale ressaltar que devido à virulência do biofilme endodôntico, seja pela presença de *E. faecalis* ou associações a outros microrganismos, estas substâncias necessitam desempenhar um papel primordial, sendo um potente antimicrobiano.

Desta forma observou-se que a viabilidade celular (UFC/mL) de *E. faecalis* expostas ao cinamaldeído e a clorexidina à 2% foi diminuída. Já o  $\alpha$ -terpineol apresentou resultados pouco encorajadores no uso como solução irrigadora auxiliar, de modo a ser similar ao controle negativo. Chama-se atenção para o efeito diminuído do NaOCl em um biofilme cultivado por 14 dias.

Diante disto, ao comparar os fitoconstituintes avaliados, observa-se que o cinamaldeído apresenta efeito positivo frente ao biofilme de *E. faecalis*, após 14 dias em cultivo. Este efeito é relatado na literatura onde o *E. faecalis* (ATCC 19443) apresentou resistência bacteriana frente alguns antibióticos, como a penicilina, mas foi inibido pela concentração inibitória mínima de cinamaldeído de 0,25 mg/ml [21].

O potencial efeito antimicrobiano do cinamaldeído determinado pelo presente estudo está baseado na interação da molécula do fitoconstituinte, a partir do seu grupamento fenólico ligado a um anel aromático, o qual confere hidrofobicidade a

molécula. Este grupamento tem o poder de promover desequilíbrio a nível de membrana celular bacteriana, agindo na camada fosfolipídica [22].

Além disto, o cinamaldeído foi comparável a clorexidina a 2%, diminuindo o número de células viáveis de *E. faecalis*. Verificou-se que ambas as substâncias foram superiores ao NaOCl. A diferença encontrada entre os controles positivos são comparáveis ao de outro estudo, no qual o biofilme de *E. faecalis*, semeado em canais radiculares de dentes humanos e cultivado por 7 dias foi inibido com o uso da clorexidina à 2%, sendo esta mais efetiva que o NaOCl à 5%, em valores absolutos. Os autores atrelam estes resultados além da complexidade dos canais radiculares e a presença do próprio biofilme, a exposição às soluções que foi de apenas 5 minutos [5].

Estudos determinam a eficácia antimicrobiana do NaOCl em concentrações acima de 5% [16,23], e afirmaram que este efeito é dependente da concentração, tempo de exposição e taxa de renovação da substância, quando esta é utilizada como solução irrigadora frente biofilmes de *E. faecalis* [24]. Embora, não tenha sido observada diminuição no número de células viáveis a partir do uso de NaOCl, a concentração utilizada foi de 2%, pois sabe-se que quanto mais elevada, possuirá mais citotoxicidade a mucosa e tecidos periodontais [25]. Vale ressaltar que uma solução química auxiliar é utilizada justamente para remover o remanescente da instrumentação. Neste estudo foi utilizado exclusivamente o método químico durante o experimento.

Em relação ao  $\alpha$ -terpineol verificou-se que este não diferiu do controle de crescimento em nenhuma das análises, não apresentando atividade antibacteriana frente *E. faecalis* na concentração e tempo avaliados. A eficácia antimicrobiana, antifúngica e anti-inflamatória de óleos da *Melaleuca alternifolia* frente diferentes microrganismos a exemplo de *S. aureus* e *C. albicans*, tem sido estudada [26, 27, 28]. Entretanto, a relação entre o efeito antibacteriano frente ao *E. faecalis* não é apontada na literatura. Sugere-se que concentrações superiores do fitoconstituente possam inibir biofilmes maduros.

Outro padrão avaliado a partir da cultura do biofilme de *E. faecalis* foi a produção de proteínas totais a partir do método do biureto. Este método determina a mensuração das proteínas presentes tanto na matriz do biofilme coletado, quanto pelas proteínas intracelulares presentes no momento da lise celular, causada durante o próprio teste. Entretanto, é recomendado para detecção inespecífica de proteínas presentes na saliva, soro ou plasma sanguíneo [29]. Assim, embora seus resultados estejam expressos pelo presente estudo, o método utilizado pode não ser sensível a concentração de proteínas presentes nas amostras.

Além disto, o teste em questão é determinado pela reação de biureto e ocorre na presença de íons cobre e hidróxido de sódio [29], de modo que a presença de um meio alcalino possa gerar a determinação de resultados falso negativo. O presente estudo apresentou como resultados os valores de normalização dos dados, entre a concentração de proteínas e o número de células viáveis (log UFC/mL), na tentativa de diminuir este erro inerente a presença do NaOCl residual nas amostras, bem como a presença de precipitados da solução de CHX (dados não exibidos), apesar da lavagem final dos espécimes.

Deste modo a discussão entre os reais resultados obtidos a partir do teste da dosagem de proteínas totais limita-se a comparação entre os fitoconstituintes e o controle de crescimento. De modo linear aos resultados obtidos para a contagem de células viáveis, o cinamaldeído determinou a redução da concentração de proteínas tanto na matriz extra celular como no metabolismo do microrganismo. De modo semelhante, o  $\alpha$ -terpineol não apresentou efeitos deletérios frente a produção de

proteínas totais, de modo a sustentar os achados determinados pela contagem de UFC/mL.

Assim, diante dos resultados obtidos sugere-se que o cinamaldeído tem efeito sobre o biofilme de *E. faecalis* sendo uma substância de promissora atividade antibacteriana. Entretanto, outros estudos laboratoriais ainda são necessários para comprovar este efeito sobre biofilmes multiespécies, os quais oferecerão maior resistência a substância, bem como associação a técnicas mecânicas, de modo a avaliar o fitoconstituente como uma verdadeira substância auxiliar. Adicionalmente, ensaios que envolvam a citotoxicidade do fitoconstituente, bem como seus alvos moleculares de ação devem ser elucidados.

## Conclusão

O cinamaldeído foi o fitoconstituente que apresentou efeito antibacteriano frente biofilme endodôntico de *E. faecalis* na concentração e tempo de cultura avaliados.

## Referências

- 1- Mohammadi Z, Palazzi F, Giardino L, Shalavi S. Microbial biofilms in endodontic infections: an update review. Biomed J. 2013;36(2):59-70. doi:10.4103/2319-4170.110400.
- 2- Jhahharia K, Parolia A, Shetty KV, Mehta LK. Biofilm in endodontics: A review. J Int Soc Prev Community Dent. 2015; 5(1):1-12. doi: 10.4103/2231-0762.151956.
- 3- Wang J, Jiang Y, Chen W, Zhu C, Liang J. Bacterial flora and extraradicular biofilm associated with the apical segment of teeth with post-treatment apical periodontitis. J Endod. 2012;38(7):954-9. doi: 10.1016/j.joen.2012.03.004.
- 4- Zhang C, Du J, Peng Z. Correlation between Enterococcus faecalis and Persistent Intraradicular Infection Compared with Primary Intraradicular Infection: A Systematic Review. J Endod. 2015; 41(8):1207-13. doi: 10.1016/j.joen.2015.04.008.
- 5- de Almeida J, Cechella BC, Bernardi AV, de Lima Pimenta A, Felipe WT. Effectiveness of nanoparticles solutions and conventional endodontic irrigants against Enterococcus faecalis biofilm. Indian J Dent Res. 2018;29(3):347-351. doi: 10.4103/ijdr.IJDR\_634\_15.
- 6- Siqueira JF Jr, Rôças IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. J Dent Res. 2009; 88(11):969-81. doi: 10.1177/0022034509346549.
- 7- Siqueira JF Jr, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. J Endod. 2008;34(11):1291-1301.e3. doi: 10.1016/j.joen.2008.07.028.
- 8- Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in endodontics. Dent Clin North Am. 2010;54(2):291-312. doi: 10.1016/j.cden.2009.12.001.
- 9- Kishen A. Mechanisms and risk factors for fracture predilection in endodontically treated teeth. Endod Top. 2006;13(1):57-83.
- 10- Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. Int Endod J. 2009;42(4):288-302. doi: 10.1111/j.1365-2591.2008.01540.x.
- 11- Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effectiveness of endodontic disinfecting solutions against young and old Enterococcus faecalis biofilms in dentin canals. J Endod. 2012;38(10):1376-9. doi: 10.1016/j.joen.2012.06.035.
- 12- Taneja S, Mishra N, Malik S. Comparative evaluation of human pulp tissue dissolution by different concentrations of chlorine dioxide, calcium hypochlorite

- and sodium hypochlorite: An in vitro study. *J Conserv Dent*. 2014;17(6):541–545. doi:10.4103/0972-0707.144590.
- 13- Abuhaimed TS, Abou Neel EA. Sodium Hypochlorite Irrigation and Its Effect on Bond Strength to Dentin. *Biomed Res Int*. 2017;2017:1930360. doi: 10.1155/2017/1930360.
  - 14- Saleh AA, Ettman WM. Effect of endodontic irrigation solutions on microhardness of root canal dentine. *J Dent*. 1999;27(1):43–6.
  - 15- Kim SW, Shin DH. Antibacterial effect of urushiol on *E. faecalis* as a root canal irrigant. *Restor Dent Endod*. 2017;42(1):54-59. doi: 10.5395/rde.2017.42.1.54.
  - 16- Moradi F, Haghgoo R. Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Nanosilver Solution, Sodium Hypochlorite and Normal Saline in Root Canal Irrigation of Primary Teeth. *Contemp Clin Dent*. 2018;9(2):227-232. doi: 10.4103/ccd.ccd\_95\_18.
  - 17- Shreaz S, Wani WA, Behbehani JM, Raja V, Irshad M, Karched M, Ali I, Siddiqi WA, Hun LT. Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents. *Fitoterapia*. 2016;112:116-31. doi: 10.1016/j.fitote.2016.05.016.
  - 18- Nogueira MN, Aquino SG, Rossa Junior C, Spolidorio DM. Terpinen-4-ol and alpha-terpineol (tea tree oil components) inhibit the production of IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10 on human macrophages. *Inflamm Res*. 2014;63(9):769-78. doi: 10.1007/s00011-014-0749-x.
  - 19- Ramage G, et al. Antifungal, cytotoxic, and immunomodulatory properties of tea tree oil and its derivative components: potential role in management of oral candidosis in cancer patients. *Front Microbiol*. 2012;18;3:220. doi: 10.3389/fmicb.2012.00220.
  - 20- Kandaswamy D, Venkateshbabu N. Root canal irrigants. *J Conserv Dent*. 2010;13(4):256–264. doi:10.4103/0972-0707.73378.
  - 21- Ferro TA et al. Cinnamaldehyde Inhibits *Staphylococcus aureus* Virulence Factors and Protects against Infection in a *Galleria mellonella* Model. *Front Microbiol*. 2016;21;7:2052. doi: 10.3389/fmicb.2016.02052.
  - 22- Vasconcelos NG, Croda J, Simionatto S. Antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents: A review. *Microb Pathog*. 2018;120:198-203. doi:10.1016/j.micpath.2018.04.036.
  - 23- Pourhajibagher M, Chiniforush N, Shahabi S, Palizvani M, Bahador A. Antibacterial and Antibiofilm Efficacy of Antimicrobial Photodynamic Therapy Against Intracanal *Enterococcus faecalis*: An In Vitro Comparative Study with Traditional Endodontic Irrigation Solutions. *J Dent (Tehran)*. 2018;15(4):197–204.
  - 24- Retamozo B, Shabahang S, Johnson N, Aprecio RM, Torabinejad M. Minimum contact time and concentration of sodium hypochlorite required to eliminate *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2010;36(3):520-3. doi: 10.1016/j.joen.2009.12.005.
  - 25- Bosch-Aranda ML, Canalda-Sahli C, Figueiredo R, Gay-Escoda C. Complications following an accidental sodium hypochlorite extrusion: A report of two cases. *J Clin Exp Dent*. 2012;4(3):194-8. doi: 10.4317/jced.50767.
  - 26- Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(1):50–62. doi:10.1128/CMR.19.1.50-62.2006
  - 27- Sharifi-Rad J, et al. Plants of the *Melaleuca* Genus as Antimicrobial Agents: From Farm to Pharmacy. *Phytother Res*. 2017;31(10):1475-1494. doi: 10.1002/ptr.5880.
  - 28- Casarin M, Pazinato J, Santos RCV, Zanatta FB. *Melaleuca alternifolia* and its application against dental plaque and periodontal diseases: A systematic review. *Phytother Res*. 2018;32(2):230-242. doi: 10.1002/ptr.5974.



- 29- Zaia, Dimas A. M., Zaia, Cássia Thaïs B. V., & Lichtig, Jaim. Determination of total protein by spectrophotometry: advantages and disadvantages of proposed methods. *Química Nova*. 1998;21(6):787-793. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-40421998000600020>.

**Normas da revista Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada –  
PBOCI (Qualis B3)**

**Author Guidelines**

**THE MANUSCRIPT SENT FOR PUBLICATION MUST BE ORIGINAL AND THE SIMULTANEOUS SUBMISSION TO OTHER JOURNAL, EITHER NATIONAL OR INTERNATIONAL, IS NOT ALLOWED.**

**MANUSCRIPTS SHOULD BE SUBMITTED BY ONE OF THE AUTHORS OF THE MANUSCRIPT THROUGH THE ONLINE SYSTEM; HOWEVER, THE NAMES AND EMAILS AND ORCID IDs OF ALL AUTHORS MUST BE ENTERED DURING SUBMISSION. ONLY ONLINE SUBMISSIONS ARE ACCEPTED TO FACILITATE RAPID PUBLICATION. SUBMISSIONS BY ANYONE OTHER THAN ONE OF THE AUTHORS WILL NOT BE ACCEPTED. THE SUBMITTING AUTHOR TAKES RESPONSIBILITY FOR THE PAPER DURING SUBMISSION AND PEER REVIEW.**

**AUTHORSHIP: EVERYONE LISTED AS AN AUTHOR SHOULD MEET OUR CRITERIA FOR AUTHORSHIP. EVERYONE WHO MEETS OUR CRITERIA FOR AUTHORSHIP MUST BE LISTED AS AN AUTHOR. WE EXPECT THAT ALL AUTHORS WILL TAKE PUBLIC RESPONSIBILITY FOR THE CONTENT OF THE MANUSCRIPT SUBMITTED TO PBOCI. THE CONTRIBUTIONS OF ALL AUTHORS MUST BE DESCRIBED.**

**INSTRUCTIONS**

**The manuscript should be written in ENGLISH (USA) language, in a clear, concise and objective form. However, when the article is accepted (in Portuguese) the authors should provide the English language text file and also send the statement of the technical reviewer. Contact PBOCI by [apesb@terra.com.br](mailto:apesb@terra.com.br) to get information about the recommended translation companies. Linguistic revisions performed by companies that do not provide the mentioned certificate will not be accepted.**

**The text should be provided as a Word for Windows file (doc), using a size 12 Times New Roman font, A4 page size, single-spacing and margins of 2.5 cm. The length of the manuscript is limited to 15 pages, including references, tables, and figures.**

**1) TITLE PAGE: Title, Author(s) [Names of all authors written out in full, including respective telephone numbers and email addresses for correspondence] and Author for correspondence. Data of institutional/professional affiliation of all authors, including Department, University (or other institution), College/program, City, State, and Country.**

**2) ABSTRACT:** A maximum of 280 words. The abstract should be structured with the following divisions: **OBJECTIVE, METHODS, RESULTS, AND CONCLUSION.**

**3) KEYWORDS:** Ranging from 3 (three) to 5 (five) five keywords, chosen from the keywords registered at Medical Subject Headings of the U.S. National Library of Medicine (<https://meshb.nlm.nih.gov>)

**4) INTRODUCTION:** State the purpose and summarize the rationale for the study or observation. The objective(s) and/or hypothesis of the study should be stated in the last paragraph. Avoid presentation of an extensive review of the field.

**5) MATERIAL AND METHODS:** Describe your selection of the observational or experimental participants (patients or laboratory animals, including controls) clearly, including eligibility and exclusion criteria and a description of the source population. Identify the methods, apparatus (give the manufacturer's name and address in parentheses), and procedures in sufficient detail to allow other workers to reproduce the results. Authors should have considered the ethical aspects of their research and should ensure that the project was approved by an appropriate ethical committee, which should be stated. Type of statistical analysis must be described clearly and carefully.

**6) RESULTS:** Present your results in a logical sequence in the text, tables, and illustrations, giving the main or most important findings first.

**7) DISCUSSION:** This is the only proper section for subjective comments and reference to previous literature. Inferences, deductions, and conclusions should be limited to the findings of the study (conservative generalization).

**8) CONCLUSION:** This should clearly explain the main conclusions of the work highlighting its importance and relevance.

**9) REFERENCES:** Authors are responsible for ensuring that the information in each reference is complete and accurate. A maximum of 40 references should be numbered consecutively in the order in which they appear in the text (Vancouver System). All references must be numbered consecutively and citations of references in text should be identified using numbers in square brackets (e.g., “as discussed by some authors [2]”; “as discussed elsewhere [1,5,12]”). Please include the DOI number .

All references should be cited within the text; otherwise, these references will be automatically removed.

**NON-REFEREED MATERIAL AND, IF POSSIBLE, NON-ENGLISH PUBLICATIONS SHOULD BE AVOIDED. CONGRESS ABSTRACTS, UNACCEPTED PAPERS, UNPUBLISHED OBSERVATIONS, AND PERSONAL COMMUNICATIONS MAY NOT BE PLACED IN THE REFERENCE LIST.**

**If seven or more authors, list up to six followed by “et al. Journal and book references should be set out as in the following examples:**

- 1. Ramalli Jr. EL, Ho W, Alves M, Rocha EM. Progress in animal experimentation ethics: a case study from a Brazilian medical school and from the international medical literature. Acta Cir Bras 2012; 27(9):659-63. doi: 10.1590/S0102-86502012000900012.**
- 2. Gilstrap LC 3rd, Cunningham FG, VanDorsten JP. Operative obstetrics. 2nd ed. New York: McGraw-Hill; 2002.**
- 3. Basbaum AI, Jessel TM, The perception of pain. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. Principles of neural science. New York: McGraw Hill; 2000. p. 472-91.**
- 4. Ministry of Health, Department of Planning. Annual Statistical Report. Abu Dhabi: Ministry of Health, 2001.**

**Tables: should be numbered consecutively with Arabic numerals and should have an explanatory title. Each table should be typed on a separate page with regard to the proportion of the printed column/page and contain only horizontal lines.**

**Figures and illustrations: Each figure should have a legend.**